

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-279491

(43)Date of publication of application : 20.10.1998

(51)Int.Cl.

A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 35/78
A61K 7/00
A61K 7/48
A61K 35/80

(21)Application number : 09-082546

(71)Applicant : KAO CORP

(22)Date of filing : 01.04.1997

(72)Inventor : KUSUOKU HIROSHI
SHIBUYA YUSUKE
NISHIZAWA YOSHINORI
FUJIKURA YOSHIAKI
KONDO HIDEHIKO
ICHIKAWA YOSHIAKI
IMOKAWA GENJI

(54) INTERLEUKIN 4 PRODUCTION INHIBITOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain both an interleukin 4 production inhibitor excellent in percutaneous absorption, stability, safety and cost and high in efficacy and an external preparation for skin and an antiallergic agent having preventing and treating effects on atopic dermatitis, by including the inhibitor.

SOLUTION: This inhibitor comprises one or more plants selected from *Urtica thunbergiana*, marine alga, *Valeriana fauriei*, *Gentianalutea*, *Geranium thunbergi*, *Nuphar japonicum*, *Filipendul aulmaria*, *Paeonia lactiflora*, *Lonicera japonica*, *Equisetumarvense*, *Achillea millefolium*, *Achillea millefolium*, *Thea sinensis*, *Centella asiatica* and *Eucalyptus globulus* or its extract as an active ingredient for interleukin 4 production.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 01.04.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-279491

(43) 公開日 平成10年(1998)10月20日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
A 6 1 K 35/78	A B F	A 6 1 K 35/78	A B F C
			Q
			W
	A D A		A D A F
	A E D		A E D T
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-82546	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(22) 出願日	平成9年(1997)4月1日	(72) 発明者	楠奥 比呂志 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会 社研究所内
		(72) 発明者	渋谷 祐輔 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会 社研究所内
		(72) 発明者	西澤 義則 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会 社研究所内
		(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インターロイキン4産生抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 経皮吸収性や安定性、安全性、価格に優れた、効力の強いインターロイキン4産生抑制剤、ならびに該抑制剤を含有する、アトピー性皮膚炎に対して予防あるいは治療効果を有する皮膚外用剤、抗アレルギー剤を提供する。

【解決手段】 インターロイキン4産生抑制剤の有効成分として、イラクサ、海藻、カノコソウ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、コウホネ、シモツケソウ、シャクヤク、スイカズラ、スギナ、セイヨウノコギリソウ、タイム、チャ、ツボクサ、ユーカリから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を使用する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 イラクサ、海藻、カノコソウ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、コウホネ、シモツケソウ、シャクヤク、スイカズラ、スギナ、セイヨウノコギリソウ、タイム、チャ、ツボクサ、ユーカリから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を有効成分とするインターロイキン4産生抑制剤。

【請求項2】 請求項1記載のインターロイキン4産生抑制剤を少なくとも1種類以上含有することを特徴とする、アトピー性皮膚炎に予防あるいは治療効果を有する皮膚外用剤組成物。

【請求項3】 請求項1記載のインターロイキン4産生抑制剤を少なくとも1種類以上含有することを特徴とする、抗アレルギー剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、インターロイキン4産生抑制剤、該インターロイキン4産生抑制剤を含有するアトピー性皮膚炎に対して予防あるいは治療効果を有する皮膚外用剤、および抗アレルギー剤に関する。

【0002】

【従来の技術】インターロイキン4は、ヒトまたは、動物の免疫応答細胞であるTリンパ球より産生される物質であり、Bリンパ球に作用してIgEやIgG4といった抗体の産生を増強することが知られている。IgEは、花粉症、アレルギー性の眼炎および鼻炎、アトピー性皮膚炎、喘息など種々のアレルギー性疾患の患者に多く見出される抗体であり、これらアレルギー性疾患の発症に深く関与していることが古くから知られている。IgEは、肥満細胞に存在するIgEレセプターに結合し、IgEがそのレセプターに結合した肥満細胞は、体内に侵入したアレルギー物質、すなわちアレルギーのIgEへの結合によってヒスタミンなどの炎症性化学物質を遊離する。ヒスタミン遊離は種々のアレルギー症状、すなわち、かゆみ、紅斑、くしゃみ、鼻水などの症状を引き起こす。このようにインターロイキン4は、上述のメカニズムを介することにより、アレルギー性疾患の発症に強く関与している。

【0003】また最近の研究により、インターロイキン4はIgEやIgG4といった抗体の産生増強作用に加えて、炎症部位への炎症性細胞の浸潤促進作用を有することが見出され、アレルギー性疾患の発症における重要性がますます注目されている。また、アレルギー性疾患のひとつであるアトピー性皮膚炎においては、その皮膚や血液中にインターロイキン4、インターロイキン5、インターロイキン10などの特定のサイトカインを多く産生するタイプのTリンパ球（タイプ2ヘルパーTリンパ球、Th2細胞）が多く見出されることがわかっており、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患におけるTh2細胞の関与が問題視されている。インターロイキ

ン5は好酸球を活性化し炎症性の物質の産生を促進する物質であり、実際アトピー性皮膚炎患者の皮膚には好酸球浸潤や好酸球由来の炎症性物質が多く見出されている。インターロイキン10は細菌やウイルスの感染防御に機能するインターフェロンの産生を抑制する作用を有した物質であり、アトピー性皮膚炎患者がしばしば黄色ブドウ球菌に易感染性であることの原因の1つとなっていると考えられる。

【0004】インターロイキン4は、上述のように抗体産生や細胞浸潤を促進する働きに加えて、未成熟なTリンパ球（タイプ0ヘルパーTリンパ球、Th0細胞）をインターロイキン4を多く産生するタイプの成熟Tリンパ球（Th2細胞）へと分化させる働きをも有している。従って、インターロイキン4産生抑制剤の提供は、IgEの産生抑制剤、ヒスタミン遊離抑制剤、IgEやヒスタミンの作用の抑制剤などの従来アレルギー性疾患に行われてきた治療法および予防法と比較して、アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患を、より根本から、治療および予防する方法を提供するものである。

【0005】さらに、インターロイキン4は多機能物質であり、皮膚の様々なトラブルと関係があるものと考えられる。インターロイキン4は角化細胞に作用してインターロイキン6の産生を増強する作用を有しており、皮膚の炎症に関与すると考えられる。またインターロイキン4によって刺激された肥満細胞は、エンドセリンに反応してヒスタミン遊離を起こすことが知られている。エンドセリンは紫外線によって角化細胞から産生されることを考えると、紫外線によるかゆみへの関与も十分考えられる。インターロイキン4は、線維芽細胞に作用してコラーゲン合成能を修飾することも知られており、しわおよびたるみに関与する可能性もある。従って、インターロイキン4産生抑制剤は、アトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の治療及び予防に有効であることに加えて、その他のインターロイキン4の関与するトラブル、すなわち、かゆみ、しわ、しみ、水虫、口内炎等のトラブルの治療および予防に有効であることが期待できる。

【0006】インターロイキン4の産生を抑制する物質としては、これまでに唯一、IPD1151Tに代表される一群のスルホニウム誘導体が知られており（Japan. J. Pharmacol. 61. 27-30(1993), Japan. J. Pharmacol. 61. 31-39(1993)）、経口薬に配合されてアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患の治療に使用されている。しかしながら、その効力は十分ではなく、経皮吸収性や安定性、安全性、価格に優れた、効力の強いインターロイキン4産生抑制剤が必要とされていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的とするところは、経皮吸収性や安定性、安全性、価格に優れた、効力の強いインターロイキン4産生抑制剤を提供することにあり、さらには、特にアトピー性皮膚炎に対

して予防あるいは治療効果を有する皮膚外用剤、ならびに抗アレルギー剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】かかる実情に鑑み、本発明者らは種々の植物またはその抽出物等についてマウスの感作リンパ球を培養系にて抗原惹起する実験系を用いてインターロイキン4産生抑制剤の探索を鋭意検討したところ、種々の植物またはその抽出物等にインターロイキン4産生抑制効果のあることを見出した。さらには、動物実験によって、これらのインターロイキン4産生抑制剤が、アトピー性皮膚炎やアレルギー疾患治療剤として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち、本発明はイラクサ、海藻、カノコソウ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、コウホネ、シモツケソウ、シャクヤク、スイカズラ、スギナ、セイヨウノコギリソウ、タイム、チャ、ツボクサ、ユーカリから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を有効成分とするインターロイキン4産生抑制剤を提供するものである。また、本発明は、イラクサ、海藻、カノコソウ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、コウホネ、シモツケソウ、シャクヤク、スイカズラ、スギナ、セイヨウノコギリソウ、タイム、チャ、ツボクサ、ユーカリから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物を有効成分とするインターロイキン4産生抑制剤を少なくとも1種類以上含有することを特徴とする、皮膚外用剤あるいは抗アレルギー剤を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明におけるイラクサは、イラクサ *Urtica thunbergiana* または *Urtica dioica* (Urticaceae) の葉または根である。本発明における海藻は、コンブ属 (*Laminaria*) などの褐藻類 (Phaeophyta)、イギス属 (*Ceramium*) などの紅藻類 (Rhodophyta)、緑藻類 (*Chlorophyta*) の全藻または雌株 (胞子葉または成実葉) である。本発明におけるカノコソウは、オミナエシ科 (Valerianaceae) の多年草であるカノコソウ *Valeriana fauriei* またはその他の近縁植物の根および根茎である。本発明におけるゲンチアナは、リンドウ科

(*Gentianaceae*) の植物ゲンチアナ *Gentiana lutea* の根および根茎である。本発明におけるゲンノショウコは、フクロソウ科 (*Geraniaceae*) の多年草ゲンノショウコ *Geranium thunbergii* の地上部である。本発明におけるコウホネは、スイレン科 (*Nymphaeaceae*) の多年草コウホネ *Nuphar japonicum* の根茎である。本発明におけるシモツケソウは、バラ科のセイヨウナツユキソウ *Filipendula ulmaria* (*Rasaceae*) の花序である。

【0011】本発明におけるシャクヤクは、ボタン科 (*Paeoniaceae*) の植物シャクヤク *Paeonia l*

actiflora (*Paeonia albiflora*) またはその他の近縁植物の根である。本発明におけるスイカズラは、スイカズラ科 (*Caprifoliaceae*) の落葉低木であるスイカズラ (*Lonicera japonica*) またはその他の同属植物の花、葉または茎である。本発明におけるスギナは、トクサ門 (*Calamophyta*) スギナ科 (*Equisetaceae*) に属する多年生シダ植物スギナ (*Equisetum arvense*) の全草である。本発明におけるセイヨウノコギリソウは、キク科 (*Compositae*) の多年生草本セイヨウノコギリソウ *Achillea millefolium* の頭花または全草である。本発明におけるタイムは、シソ科 (*Labiatae*) の小低木タイム *Thymus serpyllum* またはその同属植物タチジャコウソウ *Thymus vulgaris* の地上部である。本発明におけるチャは、ツバキ科 (*Theaceae*) の常緑低木チャ *Thea sinensis* の葉から製したものである。本発明におけるツボクサは、セリ科 (*Umbelliferae*) の植物ツボクサ *Centella asiatica* の葉および茎である。本発明におけるユーカリは、フトモモ科 (*Myrtaceae*) の常緑高木ユーカリノキ *Eucalyptus globulus* またはその他の近縁植物の葉である。

【0012】本発明に使用される種々のある植物またはその抽出物について、イラクサについて養毛効果 (特開平02-48617)、海藻については日焼け防止効果 (特開平07-242523)、抗酸化効果 (特開平07-247479、特開平07-300581)、カノコソウについてはテストステロン5 α -リダクターゼ作用 (特開平04-342535)、プロテアーゼ阻害作用 (特開平06-25000)、ゲンチアナについてはスーパーオキシド消去作用 (特開平04-5237)、美白作用 (特開平04-273808)、ゲンノショウコについてはテストステロン5 α -リダクターゼ作用 (特開昭60-146829)、シミ防止作用 (特開昭60-214721、特開昭61-122209)、ヒアルロニダーゼ失活作用 (特開平02-11520)、スーパーオキシド消去作用 (特開平04-5237)、コウホネについては日焼け後のほてり・かみそりまけ・肌荒れ等防止作用 (特開昭62-51606)、洗浄による肌のつっぱり感やかさつき感の防止作用 (特開昭63-57696)、シモツケソウについては瘦身作用 (特開昭61-155305)、シャクヤクについてはテストステロン5 α -リダクターゼ作用 (特開昭60-146829)、ヒアルロニダーゼ失活作用 (特開平02-11520)、スーパーオキシド消去作用 (特開平04-5237)、抗菌作用 (特開平06-279256)、スイカズラについては肥満細胞ヒスタミン遊離抑制作用 (特開平06-183991)、インターフェロン誘起作用 (特開昭57-118519)、抗酸化作用 (特開平03-56585)、スギナについてはパーマ処理した毛髪へのパーマ保持性付与効果および毛髪への

弾力性付与効果（特開平02-172907）、コウジ酸またはその誘導体の抗炎症作用を相乗的に高め白色作用の発現を高める効果（特開平07-25762）、セイヨウノコギリソウについてはテストステロン5 α -リダクターゼ作用（特開平05-255102）、チロシナーゼ生成阻害効果（特開平08-104646）、タイムについては活性酸素抑制効果（特開平08-119869）、チャについてはリパーゼ阻害作用（特開平01-90131）、ヒアルロニダーゼ阻害作用（特開平01-128933）、ツボクサについてはフケ防止作用（特開昭63-96117）、美白作用（特開平08-133952）、ユーカリについては整腸効果・糖質の吸収抑制効果・コレステロール排泄促進効果（特開平06-133732）、などを有することが知られている。また、ある植物またはその抽出物についてはすでに一般の皮膚外用剤、化粧料として知られているものもあるが、本発明に使用されるすべての植物またはその抽出物について、インターロイキン4産生抑制効果を有することについては、全く知られていなかった。

【0013】本発明に使用される植物またはその抽出物においては、当該植物体をそのまま乾燥粉碎して用いても、抽出して用いても良い。その抽出方法は、その粉碎物を通常3〜100℃で水および／または石油エーテル、n-ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、トルエン、ベンゼン、ジクロロメタン、クロロホルム、エーテル、酢酸エチル、ブタノール、アセトン、プロパノール、エタノール、メタノール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等の1種または2種以上の混合物、好ましくはエタノール、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、および水の1種または2種以上の混合物、例えば水性アルコールを用い、通常3〜70℃で抽出処理して得られる。本発明に使用される種々の植物またはその抽出物は、種々の抽出法を利用して抽出しても良いが、市販品を利用することができる。この抽出物はそのままインターロイキン4産生抑制剤等の有効成分として用いることができるが、該抽出物をさらに適当な分離手段、例えばゲル濾過やシリカゲルカラムクロマト法、高速液体クロマト法などにより活性の高い画分を分画して用いることもできる。

【0014】本発明のインターロイキン4産生抑制剤は細胞毒性が低く、外用および内服のいずれの方法でも投与可能である。本発明のインターロイキン4産生抑制剤を含有する皮膚外用剤組成物には、前記抽出物類の他、通常使用される外用基材、他の薬効成分等を配合できる。ここで用いられる外用基材としては、油性基剤をベースとするもの、油／水、水／油型の乳化系基剤をベースとするもの、および、水をベースとするもののいずれであっても良い。

【0015】油性基剤としては、特に制限はなく例えば、植物油、動物油、合成油脂肪酸、天然／合成のグリ

セリド等が挙げられる。また、保湿剤、紫外線吸収剤、アルコール類、キレート類、pH調整剤、防腐剤、増粘剤、色素、香料等を任意に組み合わせて配合することができる。また、上記薬効成分としては特に制限はなく、例えば鎮痛消炎剤、殺菌消毒剤、ビタミン類、皮膚柔軟化剤等を必要に応じて適宜使用できる。これら皮膚外用組成物の形態としては、軟膏、クリーム、乳液、化粧水、パック、ファンデーション等が挙げられる。前記インターロイキン4産生抑制剤の配合量、投与量は、化粧品、医薬品、医薬部外品として通常の範囲内のものであれば特に制限はないが、通常は有効成分として成人1日あたり0.1〜2000mgの範囲で用いられる。

【0016】

【実施例】次に、本発明をさらに詳細に説明するために実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0017】植物抽出物の調製

【0018】（製造例1）イラクサの葉の乾燥粉碎物100gに50%のプロピレングリコール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.8gをシロップとして得た。

【0019】（製造例2）海藻（ケルブ）全藻の乾燥粉碎物100gに80%プロピレングリコール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物2.8gをシロップとして得た。

【0020】（製造例3）カノコソウの根の乾燥粉碎物100gに精製水1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.2gをシロップとして得た。

【0021】（製造例4）ゲンチアナの根茎の乾燥粉碎物100gに50%エタノール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.7gをシロップとして得た。

【0022】（製造例5）ゲンノショウコの地上部の乾燥粉碎物100gに50%エタノール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物5.1gをシロップとして得た。

【0023】（製造例6）コウホネの乾燥粉碎物100gに1,3-ブチレングリコール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽

出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物4.2gをシロップとして得た。

【0024】(製造例7)シモツケソウの花序の乾燥粉砕物100gに50%1,3-ブタンジオール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物5.3gをシロップとして得た。

【0025】(製造例8)シャクヤクの根の乾燥粉砕物100gに50%1,3-ブタンジオール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.8gをシロップとして得た。

【0026】(製造例9)スイカズラの花の乾燥粉砕物100gに50%1,3-ブタンジオール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物4.4gをシロップとして得た。

【0027】(製造例10)スギナの全草の乾燥粉砕物100gに50%プロピレングリコール1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.4gをシロップとして得た。

【0028】(製造例11)セイヨウノコギリソウの全草の乾燥粉砕物100gに20%1,3-ブタンジオール、20%プロピレングリコールを含む水1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.8gをシロップとして得た。

【0029】(製造例12)タイム(*Thymus serpyllum*)の地上部の乾燥粉砕物100gに20%1,3-ブタンジオール、20%プロピレングリコールを含む水1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.5gをシロップとして得た。

【0030】(製造例13)チャの葉から製された緑茶の乾燥粉砕物100gに20%1,3-ブタンジオール、30%エタノールを含む水1リットルを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物6.3gをシロップとして得た。

【0031】(製造例14)ツボクサの葉の乾燥粉砕物100gに50%プロピレングリコール1リットルを加

え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物4.9gをシロップとして得た。

【0032】(製造例15)ユーカリの葉の乾燥粉砕物100gに50%プロピレングリコールを加え、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行った。得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃で3日間静置した後再度濾過して上澄みを得、これを濃縮して溶剤を除去し抽出物3.5gをシロップとして得た。

【0033】つぎに、イラクサ、海藻、カノコソウ、ゲンチアナ、ゲンノショウコ、コウホネ、シモツケソウ、シャクヤク、スイカズラ、スギナ、セイヨウノコギリソウ、タイム、チャ、ツボクサ、ユーカリから選ばれる1種または2種以上の植物またはその抽出物が優れたインターロイキン4産生抑制活性を有し、アトピー性皮膚炎に予防あるいは治療効果を有する皮膚外用剤、抗アレルギー剤等として有用であることについて試験例により具体的に説明する。

【0034】(試験例1) インターロイキン4産生抑制能の測定

Balb/cマウスに、200μgの蛋白質抗原(カサガイヘモシアニン)をフロイントの完全アジュバントと共に皮下注射し感作した。7日後、リンパ節を摘出し、Phosphate Buffered Saline(以下「PBS」と略す)中で解して、リンパ球の懸濁液を調製した。調製したリンパ球を96穴プレートに1ウェル当たり 4×10^5 細胞の濃度でまき、製造例1から15で得られた植物抽出物を最終濃度0.01%となる様に添加した10%牛血清加RPMI 1640培地を用いて37℃、一晚培養した後、蛋白質抗原(カサガイヘモシアニン)を添加した(最終濃度10μg/ml)。さらに3日間の培養の後、その培養上清をELISA法による定量に供した。

【0035】ELISA法による定量は、以下の様に行なった。50μlの4μg/ml抗インターロイキン4抗体あるいは2μg/ml抗インターロイキン2抗体(いずれもPBS溶液)をELISAプレートに加えて4℃で一晩インキュベートした。0.05% Tween 20を含むPBS(以下、「PBS/Tween」と略す)でプレートを洗浄の後、3%Bovine Serum Albumin(以下、「BSA」と略す)を含むPBSを加えて、室温で2時間インキュベートしプレートのブロッキングを行った。PBS/Tweenで洗浄の後、70μlのサンプルすなわち培養上清を添加し、室温で4時間インキュベートした。PBS/Tweenで洗浄の後、100μlの2μg/mlビオチン標識抗インターロイキン4抗体あるいはビオチン標識抗インターロイキン2抗体(いずれも3%のBSAを含むPBS溶液)を加えて室温で45分間インキュベートした。

PBS/Tweenで洗浄の後、100 μ lのABC溶液 (Avidin-peroxidase と BiotinのComplex, Vectrain社のABCキットを使用)を加え、室温で30分間インキュベートした。PBS/Tweenで洗浄の後、100 μ lの基質溶液 (ABTS)を加えて発色反応を行い、プレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。インターロイキン4およびインターロイキン2産生抑制率を、溶媒コントロールに対する抑制率を算出し、植物抽出物のサイトカイン抑制効果を判定した。すなわちインターロイキン4およびインターロイキン2産生抑制率 (%) (以下の表中では、それぞれ「IL4抑制率」、「IL2抑制率」と略記する)は、植物抽出物を含有しない抽出溶液のみを加えたときのインターロイキン産生を何%抑制するかを示すものである。

【0036】また、植物抽出物の細胞毒性を調べるため、MTTアッセイを行った。MTTアッセイには、MTTアッセイキット (ケミコン社)を使用した。MTTとは、生細胞のミトコンドリアによって分解されて薄い*

*黄色から濃い青色に変化する物質であり、MTTアッセイにより植物抽出物の細胞毒性を知ることができる。アッセイは使用説明書に従って行い、溶媒コントロールに対する抑制率を算出し、植物抽出物の細胞毒性を判定した。MTT分解活性抑制率 (%)は、植物エキスを含有しない抽出溶媒のみを加えたときのMTT分解活性を何%抑制するかを示すものである。すなわち、毒性の高いものほど抑制率は高い。その結果、表1に示した植物抽出物について、インターロイキン4産生抑制効果が認められた。また、これらの植物抽出物にインターロイキン2産生抑制効果は認められず、抑制効果はインターロイキン4に特異的であった。さらに、これらの植物抽出物の細胞毒性は極めて弱いものであった。したがって、これらの植物抽出物は、インターロイキン4の産生によって引き起こされる、アトピー性皮膚炎に対する外用剤や抗アレルギー剤として有用なものである。

【0037】

【表1】

植 物	IL4抑制率 (%)	IL2抑制率 (%)	MTT分解活性抑制率 (%)
イラクサ	62.4	1.2	-2.7
海藻	62.2	7.3	-10.3
カノコソウ	71.7	8.0	-1.7
ゲンチアナ	71.3	6.8	6.3
ゲンノショウコ	66.5	16.4	3.4
コウホネ	71.4	7.2	7.1
シモツケソウ	62.9	2.2	9.7
シャクヤク	71.0	-3.5	3.2
スイカズラ	73.0	16.0	7.8
スギナ	70.4	-5.3	1.2
セイヨウノコギリソウ	61.4	9.1	4.3
タイム	62.3	9.3	-1.2
チャ	74.1	-9.7	-1.2
ツボクサ	80.8	-15.3	-4.3
ユーカリ	71.1	-8.2	4.7

【0038】つぎに、さらに本発明を詳細に説明するために、皮膚におけるインターロイキン4産生抑制効果の試験例について述べる。

(試験例2) 製造例1から15で得られた植物抽出物について、Balb/cマウスを用いた動物実験系により皮膚インターロイキン4産生抑制効果を評価した。Balb/cマウスに、200 μ gの蛋白質抗原 (カサガイヘモシアニン)をフロイントの完全アジュバントと共に皮下注射し感作した。感作後、耳介部の皮膚に表2に示した植物のエタノール抽出物 (1%)を10 μ l、一日2回塗布した。感作一週間後、50 μ gの蛋白質抗原

(カサガイヘモシアニン)を耳介部に皮下注射し、惹起した。惹起の24時間後に耳介部を切除し、背側の皮膚より、AGPC法 (ニッポンジーン社 ISOGENを使用)で全RNAを精製した。

【0039】100 μ lのPCR反応液当たり200ngの全RNAに由来するcDNAを使用し、インターロイキン4のプライマーを用いたPCRを行った。PCRに使用したインターロイキン4のプライマーは、5'-AGTTGTCATCCTGCTCTTCTTTCTC-3'と5'-CGAGTAATCCATTTGCATGATGCTC-3'である。PCRには、最終濃度0.

5 M (100 μ l) の反応液当たり 50 pmole) のプライマーを使用した。PCR は、反応が飽和していないサイクル数すなわち 30 サイクル行った。PCR の 1 サイクルは、94℃、1 分の変性反応、60℃、2 分のアニール反応、72℃、1.5 分の伸張反応を行った。5 μ l の PCR 反応液を 1% アガロースゲルで電気泳動分離したのち、ゲルをエチジウムブロマイド染色して、FM-BIO100 (日立製作所製) を用いてゲル中の PCR 産物を検出しおよびその蛍光強度を測定した。インターロイキン 4 およびインターロイキン 2 産生抑制率を、溶媒コントロールに対する抑制率として算出し、植物抽出物のサイトカイン抑制効果を判定した。すなわちインターロイキン 4 およびインターロイキン 2 産生抑制率 (%) は、植物抽出物を含有しない抽出溶媒のみを塗布したときのインターロイキン遺伝子発現を何%抑制するかを示すものである。結果は表 2 に示した通りであり、これらの植物抽出物は、インターロイキン 4 の産生を特異的に抑制するものであった。したがって、これらの植物抽出物は、インターロイキン 4 の産生によって引き起される、アトピー性皮膚炎に対する外用剤や抗アレルギー剤として有用なものである。

【0040】

【表 2】

植 物	IL4 抑制率 (%)	IL2 抑制率 (%)
イラクサ	51.5	-1.5
海藻	58.7	6.9
カノコソウ	76.1	6.3
ゲンチアナ	68.4	13.1
ゲンノショウコ	58.6	7.8
コウホネ	62.1	13.3
シモツケソウ	55.8	2.5
シャクヤク	60.7	1.7
スイカズラ	60.6	13.9
スギナ	55.8	-4.0
セイヨウノコギリソウ	53.9	11.4
タイム	56.9	2.1
チャ	73.3	-6.9
ツボクサ	70.4	-14.6
ユーカリ	75.0	1.6

【0041】 つぎに、各製造例で得られた植物の抽出物を使用して、各種の製剤を調製した実施例を以下に説明する。

【0042】 (実施例 1) 製造例 1 で得られたイラクサ抽出物 1 g、コレステロール 0.5 g、コレステリルイソステアレート 1 g、ポリエーテル変性シリコーン 1.

5 g、環状シリコーン 20 g、メチルフェニルポリシロキサン 2 g、メチルポリシロキサン 2 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、55% エタノール 5 g、カルボキシメチルキサン 0.5 g、精製水を混合しクリーム 100 g とした。

【0043】 (実施例 2) 製造例 2 で得られた海藻抽出物 1 g、製造例 10 で得られたスギナ抽出物 1 g、コレステロール 0.5 g、コレステリルイソステアレート 1 g、ポリエーテル変性シリコーン 1.5 g、環状シリコーン 20 g、メチルフェニルポリシロキサン 2 g、メチルポリシロキサン 2 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、55% エタノール 5 g、カルボキシメチルキサン 0.5 g、精製水を混合しクリーム 100 g とした。

【0044】 (実施例 3) 製造例 3 で得られたカノコソウ抽出物 1 g、製造例 4 で得られたゲンチアナ抽出物 1 g、コレステロール 0.5 g、コレステリルイソステアレート 1 g、ポリエーテル変性シリコーン 1.5 g、環状シリコーン 20 g、メチルフェニルポリシロキサン 2 g、メチルポリシロキサン 2 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、55% エタノール 5 g、カルボキシメチルキサン 0.5 g、精製水を混合しクリーム 100 g とした。

【0045】 (実施例 4) 製造例 4 で得られたゲンチアナ抽出物 1 g、製造例 6 で得られたコウホネ抽出物 1 g、製造例 9 で得られたスイカズラ抽出物 1 g、コレステロール 0.5 g、コレステリルイソステアレート 1 g、ポリエーテル変性シリコーン 1.5 g、環状シリコーン 20 g、メチルフェニルポリシロキサン 2 g、メチルポリシロキサン 2 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、55% エタノール 5 g、カルボキシメチルキサン 0.5 g、精製水を混合しクリーム 100 g とした。

【0046】 (実施例 5) 製造例 5 で得られたゲンノショウコ抽出物 3 g、コレステリルイソステアレート 3 g、流動パラフィン 10 g、グリセリルエーテル 1 g、グリセリン 10 g、白色ワセリン 73 g を混合し、軟膏とした。

【0047】 (実施例 6) 製造例 2 で得られた海藻抽出物 50 g、ヒドロキシプロピルセルロース 80 g、軽質無水ケイ酸 20 g、乳糖 50 g、結晶セルロース 50 g、タルク 50 g を常法により直径 9 mm、重量 200 mg の錠剤とした。

【0048】 (実施例 7) 製造例 3 で得られたカノコソウ抽出物 50 g、ヒドロキシプロピルセルロース 80 g、軽質無水ケイ酸 20 g、乳糖 50 g、結晶セルロース 50 g、タルク 50 g を常法により直径 9 mm、重量 200 mg の錠剤とした。

【0049】 (実施例 8) 製造例 2 で得られた海藻抽出物 40 g、結晶セルロース 50 g、乳糖 75 g、軽質無水ケイ酸 10 g を常法によりカプセル剤とした。

【0050】 (実施例 9) 製造例 6 で得られたコウホネ抽出物 40 g、結晶セルロース 50 g、乳糖 75 g、軽

質無水ケイ酸10gを常法によりカプセル剤とした。

【0051】（実施例10）製造例2で得られた海藻抽出物100g、乳糖100g、ヒドロキシプロピルセルロース100g、およびタルク7.5gを常法により顆粒剤とした。

【0052】（実施例11）製造例6で得られたコウホネ抽出物100g、乳糖100g、ヒドロキシプロピルセルロース100g、およびタルク7.5gを常法により顆粒剤とした。

【0053】（実施例12）製造例2で得られた海藻抽出物10g、コーンスターチ4g、結晶セルロース40g、カルボキシメチルセルロースカルシウム5g、軽質無水ケイ酸0.5g、ステアリン酸マグネシウム0.5gを混合し、打錠機にて圧縮成形して直径9mm、重量200mgの錠剤とした。

【0054】（実施例13）製造例3で得られたカノコソウ抽出物10g、結晶セルロース84.5g、ステアリン酸マグネシウム0.3gを均一に混合し、圧縮成形した後に粉碎し、カルボキシメチルセルロースカルシウム5gとステアリン酸マグネシウム0.2gを加えて混合し、打錠機にて圧縮成形して直径9mm、重量200mgの錠剤とした。

【0055】（実施例14）製造例6で得られたコウホネ抽出物5g、製造例6で得られたサイコ抽出物5g、結晶セルロース55g、10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液35gを均一に混合し、捏和し *

＊た。押出造粒機により造粒後乾燥し、篩別して顆粒剤とした。

【0056】（実施例15）製造例7で得られたシモツケソウ抽出物5g、製造例6で得られたサイコ抽出物5g、結晶セルロース55g、10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液35gを均一に混合し、捏和した。押出造粒機により造粒後乾燥し、篩別して顆粒剤とした。

【0057】（実施例16）製造例9で得られたスイカズラ抽出物5g、製造例6で得られたサイコ抽出物5g、結晶セルロース55g、10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液35gを均一に混合し、捏和した。押出造粒機により造粒後乾燥し、篩別して顆粒剤とした。

【0058】（実施例17）製造例14で得られたツボクサ抽出物5g、製造例6で得られたサイコ抽出物5g、結晶セルロース55g、10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液35gを均一に混合し、捏和した。押出造粒機により造粒後乾燥し、篩別して顆粒剤とした。

【0059】

【発明の効果】本発明のインターロイキン4産生抑制剤は、経皮吸収性や安定性、安全性、価格に優れ、強い効力を有する。またかかる抑制剤を含有する皮膚外用剤および抗アレルギー剤は、アトピー性皮膚炎に対して予防または治療効果を有する。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
A61K 7/00

識別記号

F I

A61K 7/00

K
W

7/48

7/48

35/80

35/80

Z

(72)発明者 藤倉 芳明
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社
社研究所内

(72)発明者 市川 義章
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会
社研究所内

(72)発明者 近藤 秀彦
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会
社研究所内

(72)発明者 芋川 玄爾
栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会
社研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.